製品コード 7730
7730S

研究用

TaKaRa

Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR

説明書

v201402Da

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR 法等の遺伝子検出技術を応用した手法が注目され、食品・環境分野の検査などにおいて普及しつつあります。しかし、遺伝子検出技術では原理的に、生菌だけでなく死菌由来 DNA も検出されるため、目的によっては死菌検出が偽陽性と見なされることがあります。

タカラバイオの Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズは、EMA-PCR 法（下図）により生菌由来 DNA を選択的に検出するためのキットです。独自開発の技術（特許出願中）により高い効率で EMA 処理を行い、リアルタイム PCR のように増幅サイズが短い場合でも効果的に死菌由来 DNA からの検出を抑制します。

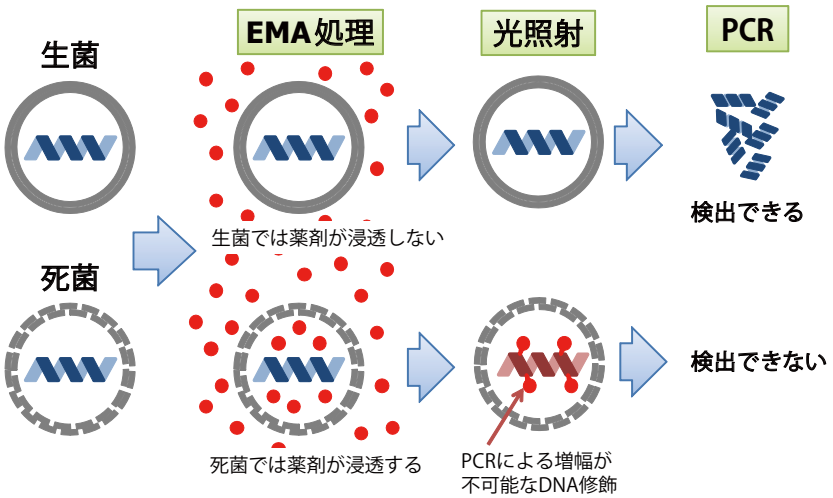
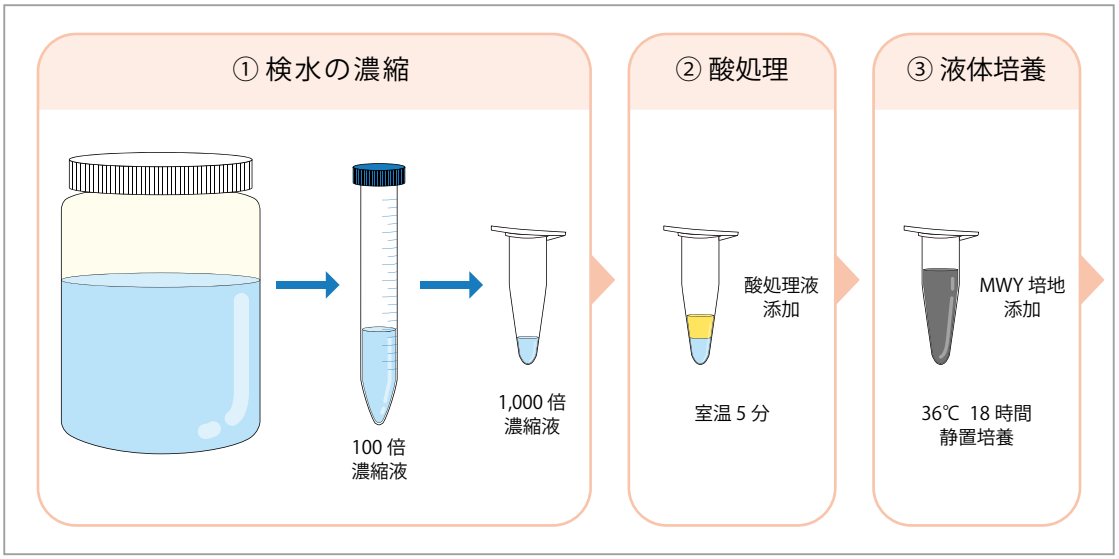


図 1. EMA-PCR 法

さらに進化した LC EMA-qPCR 法は、液体培養（LC : liquid culture）による生菌の選択的増殖と EMA-PCR 法を組み合わせることにより、より確実かつ高感度に生菌を検出するための方法です。
本製品 Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR は、LC EMA-qPCR を行う際に用いるレジオネラ属菌用に至適化された EMA 処理用キットです。本製品には、EMA 処理に必要な試薬が含まれており、検体の濃縮、液体培養、DNA 抽出、リアルタイム PCR に必要な試薬 [III. キット以外に必要な試薬および器具類 (主なもの) 参照] とともに用いることにより、レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法による生菌選択的な検出を可能にします。

1 日目



2 日目

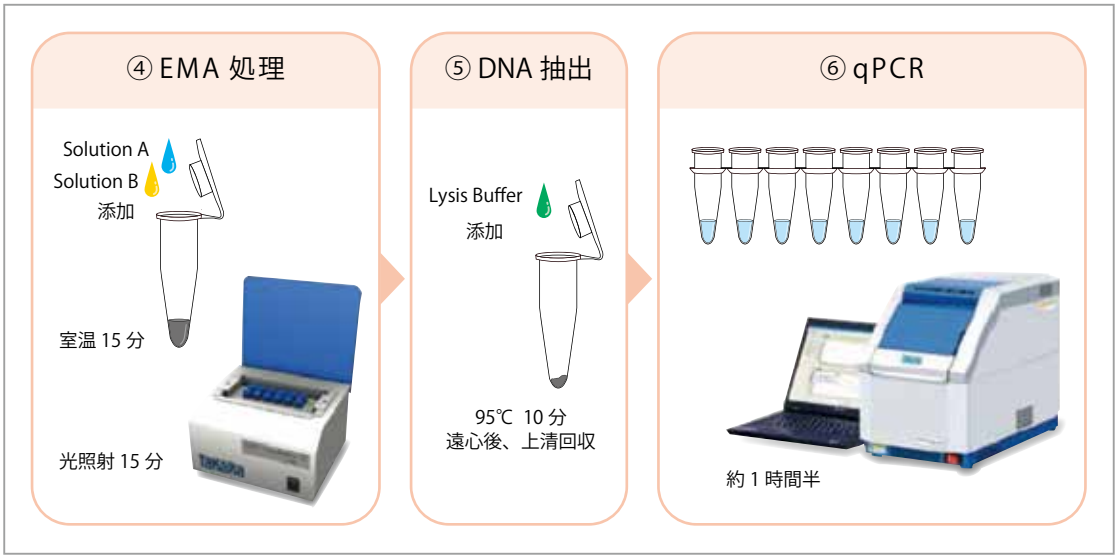


図 2. LC EMA-qPCR 法の操作フロー

※ レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法は、「厚生労働省研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 平成 24 年度分担研究報告書」で報告されました。

I. キットの内容 [製品コード 7730（50 検体分）、製品コード 7730S（25 検体分）]

		製品コード 7730	製品コード 7730S
1.	Solution A-leg (LC)	625 µl × 2	625 µl × 1
2.	Solution B-leg (LC)*	200 µl × 4	200 µl × 2

＊：光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修飾能が減衰しますので、遮光に留意してください。

Solution A-leg (LC)：
レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法に至適化した核酸修飾反応促進試薬です。EMA 処理操作の成否を確認するためのプラスミド DNA を含みます（下記【注記】参照）。

Solution B-leg (LC)：
レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法に至適化した選択的膜透過性色素（EMA）を含む溶液です。

【注記】
別売の Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）と併せて使用することで、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いた前処理操作が、検体由来成分による反応阻害などを受けることなく正しく行われたかどうかを確認することができます。
Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントには反応確認用のプラスミド DNA があらかじめ混合されており、検体に対する前処理が正しく行われると、このプラスミド DNA も同時に修飾され、PCR 増幅できない状態になります。従って、前処理を行った検体に対して、このプラスミド DNA 上の領域をターゲットとする PCR 増幅を行うことで、前処理操作の成否を確認することが可能です。

II. 保存

− 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な試薬および器具類（主なもの）

【検水の濃縮】
フィルターホルダー（47 mm メンブレンフィルター用）
メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm；Millipore 社製 Code GTTP04700、Isopore メンブレンフィルターなど）
濾過びん
吸引ポンプ
ピンセット
滅菌 50 ml コニカルチューブ

【液体培養】
酸処理液（武藤化学、Code. 41281、0.2 M 塩酸・塩化カリウム緩衝液 pH2.2）
Legionella LC Medium Base（製品コード 9016）
レジオネラ BCYE 発育サプリメント（関東化学（Oxoid）、Code. SR110）
レジオネラ MWY 選択サプリメント（関東化学（Oxoid）、Code. SR118）
インキュベーター（36℃で使用可能なもの）

【EMA 処理】
LED Crosslinker 12（製品コード EM200）＊1
または、LED Crosslinker ＊1, 2

【DNA 抽出】
Lysis Buffer for *Legionella*（製品コード 9181）

【リアルタイム PCR】
Cycleave®PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240）
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）

[注意] 本製品は、CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY210) と組み合わせて使用することはできません。リアルタイム PCR には、必ず CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit をご使用ください。

リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ
- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など

【各操作共通】
ヒートブロック（95℃で使用可能なもの）
微量高速冷却遠心機
卓上遠心機
ボルテックスミキサー
マイクロピペットおよびマイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
1.5 ml マイクロチューブ ＊3

＊1： ハロゲンランプ [岩崎電気株式会社、写真証明用アイランプ　スポット（集光形）、PRS500W] で代用できます。
＊2： 本製品の販売は終了しました。
＊3： EMA 処理には、無色透明チューブの使用を推奨します。弊社では下記のチューブで実績があります。
DNA LoBind チューブ, 1.5 ml PCR clean（Eppendorf：Code 95295）
1.5 ml ループ付凍結保存チューブ（SARSTEDT：Code 72.692.100）

IV. 使用に関して

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

使用目的： 本キットは環境分析に使用する製品です。

測定結果： 本キットは検体の前処理を行い、続いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、レジオネラ属菌の生菌由来 DNA を死菌由来 DNA と区別して検出することを目的としていますが、死菌の量や試料水の組成によっては前処理に影響が生じ、死菌由来 DNA が検出される場合もあります。従って、目的によっては培養法による検査も実施の上で、総合的に結果を判定することをお勧めします。
（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）

廃棄： 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。EMA を含む試薬を廃棄する際は、活性炭を通して色素を吸着させてから捨ててください。この際に使用した活性炭は、危険物として処理してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

(1) 装置および試薬などの取扱いは該当品の取扱説明書に従ってください。

(2) 万一、Solution B-leg (LC) が光により劣化すると、死菌由来 DNA への修飾効果が薄れ、生菌および死菌由来 DNA の区別を行うことができません。操作中は遮光に細心の注意を払ってください。使用しない間は、チューブをアルミホイルなどで覆って遮光してください。使用後は、アルミパックに入れて早めに冷凍庫に戻してください。

(3) Solution A-leg (LC) は粘性が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。

VI. 操作方法

A. 液体培養（Liquid Culture）

1. 検水の濃縮
   (1) 検水 500 ml を 100 倍濃縮し 5 ml とする。
   （「第 3 版レジオネラ症防止指針」記載の「ろ過濃縮法」等を参照。）
   (2) 100 倍濃縮液 1 ml を 15,000 rpm で 5 分間遠心後、上清 900 μl を除去して 1,000 倍濃縮液 100 μl とする。

   ※ 残りの 100 倍濃縮液は、必要に応じて 4℃で保存してください。

2. ATP 測定（可能な場合）
   (1) 100 倍濃縮液の ATP 値を測定する。

   例 : ルミテスター（キッコーマン）を用いる場合
   - 綿棒を 100 倍濃縮液に浸し、直ちに測定（検水 10 ml 相当）
   - 5,000 RLU 以上の検体は、1,000 倍濃縮液と 100 倍濃縮液の両方で以下の操作を行うとともに、A-3.(2) の酸処理時間を 20 分に延長する。

3. 酸処理
   (1) 1,000 倍濃縮液（および 100 倍濃縮液）100 μl に酸処理液 100 μl を添加する。
   (2) 室温で 5 分（または 20 分）静置する。

4. 液体培養（Liquid Culture）
   (1) MWY 液体培地 ＊ 900 μl を添加し、ボルテックスで軽く混合する。
   (2) A-4.(1) の濃縮試料液加 MWY 液体培地を 36℃、18 時間静置培養する。
   (3) 培養後、ボルテックスで混合し、100 μl を 1.5 ml マイクロチューブに分取する。

   ※ 培養後、すぐに EMA 処理を行わない場合は、4℃で保存してください。
   ※ 残りの濃縮試料液加 MWY 液体培地は、必要に応じて 4℃で保管してください。

＊：MWY 培地の調製法

1. *Legionella* LC Medium Base 90 ml を室温で溶解させる。
2. レジオネラ BCYE 発育サプリメントに滅菌蒸留水 10 ml を無菌的に添加し溶解させる。
3. 1. に 2. を無菌的に添加する。
4. レジオネラ MWY 選択サプリメントに 2 ml の滅菌蒸留水を加えて溶解し、3. に無菌的に添加し、十分に撹拌する。
5. スターラーで撹拌しながらマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、− 20℃で保存する。（活性炭によるチップの目詰まりに注意すること。）

B. EMA 処理

1. A-4.(3) で分取したサンプル 100 μl に Solution A-leg (LC) を 25 μl 添加する。

   [注意] Solution A-leg (LC) は粘性が高いので、ピペットマンでの操作はゆっくりと行い、分取した量を目視で確認してから添加してください。

2. Solution B-leg (LC) を 12.5 μl 添加する。

   【補足】
   検体数が多い場合は、予め必要量＋αの Solution A-leg (LC) & Solution B-leg (LC) の混合液を調製し、それを各チューブに分注しても良い。その際には、溶液の粘性が高いので、よく混合し、分注操作にも留意すること。

3. ボルテックスで混合した後、手で軽くスピンダウンする（チューブの蓋や壁に付いた水滴がだいたいチューブ底に落ちる程度に）。あるいは、ピペッティングにより混合する。

   [注意] 混合後、遠心機等を使用したスピンダウンは行わないこと。遠心操作により、活性炭と共にレジオネラ菌が沈殿すると、光照射が十分に行われない可能性があるため。

4. 遮光下、室温で 15 分静置する。
   （この間に活性炭が沈降し、レジオネラ菌は浮遊した状態となる。）

5. LED Crosslinker で 15 分間光照射を行う。

   [注意] 続いて、C-1. の操作を行い、この状態でのサンプル保存は行わないでください。（C-1. の操作後は、サンプルを一時保存可能です。）

   ※ LED Crosslinker による光照射は、以下の方法で代用できます。

   ハロゲンランプ［岩崎電気株式会社、証明写真用アイランプスポット（集光形）、PRS500W］の場合
   → 氷上にチューブを横置きし、照射距離 20 cm で上部から 5 分光照射

C. DNA 抽出

1. B-5. で EMA 処理を行ったサンプルを 12,000 ～ 15,000 rpm（最高速度）、4℃で 5 分遠心し、上清を除去する。ペレットを吸わないよう注意すること（少量の液体が残っても問題はない）。
   ※ 上清を除去したペレットの状態で－ 20℃保存が可能です。

2. C-1. の沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* 50 µl を添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンダウンする。
   [注意] Lysis Buffer for *Legionella* は、4℃保存で凍結厳禁です。
   使用前にボルテックス等でよく混合してください。また、分取する前にピペッティングで混合し、樹脂量が均一になるよう注意してください。なお、先端の細いチップを用いると、チップが詰まることがあります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。

3. 95℃で 10 分インキュベートする。

4. ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm（最高速度）、4℃で 10 分間遠心する。

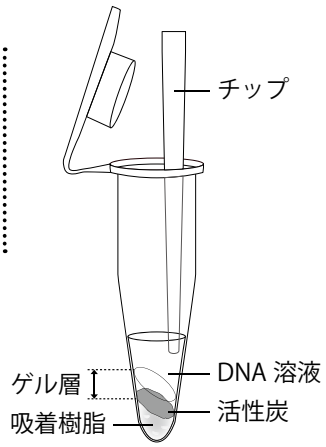
5. 氷上で 5 分間静置する。

6. 上清 25 µl を DNA 溶液として回収する。
   ※ 抽出液が青くなりますが、リアルタイム PCR 反応には影響ありません。
   ※ DNA 抽出後、直ちにリアルタイム PCR を行わない場合は、－ 20℃で保存してください。

【補足】
Lysis Buffer for *Legionella* には低濃度のゲルが添加されており、C-4. の遠心分離後、吸着樹脂の上にゲル層が形成されます（注：ゲル層は、目視では確認できません）。C-5. では、そのゲル層をしっかり固化させるため氷上で静置します。上清を回収する際は、チップの先端がゲル層に触れないよう、液面に近いところから回収するように注意してください。

◆ ここがポイント ◆

チップの先端がゲル層に触れないように、DNA 溶液を上の方からそっと吸い取ってください。



D. リアルタイム PCR（レジオネラ属菌の検出）

C-6. で調製した DNA 溶液を用いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit によるリアルタイム PCR を行う。

※ CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit の説明書の「VIII. 操作」の「VIII-2. 反応液の調製と反応開始」から、操作を行ってください。

また、C-6. で調製した同じ DNA 溶液を Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) を用いてテストし、本キットの試薬中に含まれる反応確認用プラスミド DNA が、前処理操作後、qPCR で検出されないことを確認することにより、本キットによる前処理操作が正しく行われたことを確認することができる。

【備考】

＜死菌調製法について＞

条件検討のため、死菌を調製する際は、95℃、2 分の熱処理または 1 ppm 30 分の次亜塩素酸処理を行う。遠心濃縮により菌を pellet down する操作が含まれるため、DNA が細胞外に遊離するような調製法は用いないこと。

VII. 検出結果の判断基準について

判断基準の参考情報として、以下に「厚生労働省研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 平成 24 年度分担研究報告書」で報告された内容をご紹介します。

1. LC EMA-qPCR 法におけるレジオネラ 1 CFU あたりの 16S Positive Control コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を用い、それぞれ 2 連で LC EMA-qPCR を行い、検量線を作成した。この回帰式の切片と、16S Positive Control の回帰式の切片の差から、レジオネラ 1 CFU 当りの 16S Positive Control コピー数が以下の通り算出された。

○ 18 時間培養 EMA 処理後のコピー数（レジオネラ 1 CFU 当り）

$2^{(39.984-33.276)} = 104.5 \fallingdotseq 100$ コピー

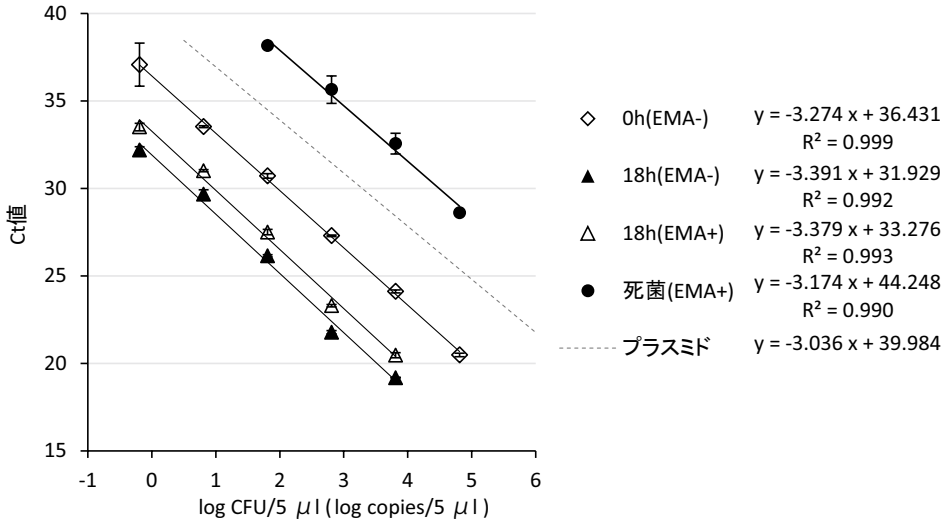


図 3. アメーバ培養レジオネラを用いた LC EMA-qPCR の検量線

図の説明：

◇ 0 h (EMA-)： 0 h（培養前）EMA 処理なし　▲ 18 h (EMA-)： 18 h（液体培養後）EMA 処理なし

△ 18 h (EMA+) : 18 h（液体培養後）EMA 処理あり　● 死菌 (EMA+)： 死菌 EMA 処理あり

--- プラスミド： 16S Positive Control (log copies/5 μl)

2. LC EMA-qPCR を用いた浴槽水等における検査結果

平成 24 年度に採取した浴槽水等 113 件について、平板培養法と LC EMA-qPCR 法の定量値を比較した。平板培養法では 38.9% (44/113) がレジオネラ陽性（10 CFU/100 ml 以上）であったのに対し、18 時間培養後に EMA 処理を行った場合、63.7% (72/113) が陽性（1 CFU/100 ml 以上）であり、感度は 95.5%、特異度は 56.5% であった。なお、後者の定量結果につき、5 CFU/100 ml 以上を陽性とすると、感度 95.5%、特異度 75.4% の良好な結果が得られたことから、カットオフ値を 5 CFU/100 ml 相当の定量値とすることで、平板培養陽性（10 CFU/100 ml）が検出可能と考えられた。

表 1. 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

（件）

		平板培養法（CFU/100 ml）		計
		≧ 10	＜ 10	
LC EMA-qPCR (CFU/100 ml)	≧ 5	42	17	59
	＜ 5	2	52	54
計		44	69	113

感度 95.5%　特異度 75.4%

VIII. 参考文献

1) Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003 Apr; **34**(4):804-808, 810, 812-813.

2) 「第 3 版レジオネラ症防止指針」（発行：財団法人ビル管理教育センター）

3) 厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合事業）「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」：平成 24 年度分担研究報告書

IX. 関連製品

Cycleave®PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240/CY240S）
Lysis Buffer for *Legionella*（製品コード 9181）
Legionella LC Medium Base（製品コード 9016）
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）
LED Crosslinker12（製品コード EM200）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)（製品コード 7700）
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positve)（製品コード 7705）
Viable *Salmonella* Selection Kit for PCR（製品コード 7711）
Viable enterohemorrhagic *E. coli* Selection Kit for PCR（製品コード 7712）
Viable *Campylobacter* Selection Kit for PCR（製品コード 7713）
Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0（製品コード 7714）

X. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cycleave、Thermal Cycler Dice はタカラバイオの登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201402Da